

El bloqueo de la adhesión fimbrial como opción terapéutica

Guillermo Barreto Argilagos; Ana Campal Espinosa, Orlando Abreu Guirado y Bertha Velázquez Pérez

Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Camagüey

RESUMEN

En numerosas enfermedades bacterianas el primer estadio de la infección depende del contacto específico bacteria-célula. En esta interacción intervienen determinados receptores celulares del hospedero y diversos factores de adhesión bacterianos, fundamentalmente fimbrias. La interrupción de este paso bloquea los subsiguientes y con ello no tiene lugar la infección. La enfermedad diarreica aguda (EDA) y las infecciones del tracto urinario (ITU) debidas a *E. coli* constituyen ejemplos al respecto, tanto en humanos como en numerosas especies animales. El bloqueo de la adhesión fimbrial se ha intentado por diversas vías: empleo de antibióticos en concentraciones subletales, aplicación de vacunas e inmunoseros, utilización de análogos estructurales a las fimbrias o a los receptores y la utilización de extractos de plantas medicinales. El trabajo enjuicia críticamente las ventajas y limitaciones de estos métodos y ofrece ejemplos de los resultados de un decenio obtenidos con la última variante. Se demuestra cómo debido a la interacción frente a un grupo de extractos de plantas utilizadas para el tratamiento de las EDA (*Eucalyptus saligna* y *Eucalyptus citriodora*) e ITU (*Achirantes aspera*, *Lepidium virginicum* L., *Ageratum conyzoides* L., *Zingiber officinale* Rose, *Curcuma longa* L., *Costus speciosus* Smith y *Xanthium occidentale* Bertol) se produce *in vitro*, el bloqueo de la expresión fimbrial y/o la interferencia en los receptores para fimbrias de *E. coli* enterotoxigénica (K88, K99 y CFA/I) y uropatógenas (P).

ABSTRACT

In a great number of bacterial diseases, the first stage of the infection depends on the specific bacteria-cell contact. The host specific cellular receptors and diverse factors, mainly fimbrias, are involved in this interaction. The interruption of this step block the next ones and the infection does not take place. The acute diarrheic diseases and the urinary tract infections due to *E. coli* are examples as much as in humans as in animal species. The fimbria adhesion blockade has been intended by different ways such as the use of antibiotics in sublethal concentrations, the application of vaccines and immunosera, the use of structural analogs to the fimbrias or the receptors and the use of medicinal plant extracts. The work critically analyzes the advantages and limitations of these methods and offers examples of the results of a decade which were obtained with the last variant. It shows how the blockade of the fimbrial expression and the interference in the receptors for fimbrias of the enterotoxigenic (K 88, K 99 y CFA / I) and uropathogenic (P) *E. coli* is produced *in vitro* due to the interaction with the plant extracts used for the treatment of EDA (*Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus citriodora*) and ITU (*Achirantes aspera*, *Lepidium virginicum* L., *Ageratum conyzoides* L., *Zingiber officinale* Rose, *Curcuma longa* L., *Costus Speciosus* Smith and *Xanthium occidentale* Bertol.).

PALABRAS CLAVES: diarrea; urosepsis; pielonefritis; *E. coli* enterotoxigénica; *E. coli* uropatógena; fimbrias; receptores fimbriales; plantas medicinales

INTRODUCCIÓN

Las infecciones gastrointestinales constituyen un problema mundial. Anualmente se producen 1647 millones de casos de diarrea. En niños menores de un año el saldo asciende a 32 millones de muertes. La enfermedad diarreica aguda (EDA) provoca el 80% de los casos. *E. coli* enterotoxigénico (ECET) es el agente que con mayor frecuencia se asocia a esta etiología. Sólo, o acompañado de rotavirus, se ha aislado del 80 % de los pacientes de EDA. Otros autores reportan aislamientos de ECET en el 20-60% de los pacientes que presentan esta enfermedad -tanto en niños como en adultos- en Africa, Asia e Iberoamérica (Agüero *et al.*, 1985; Blanco y Blanco, 1993; Black, 1993; Barreto, 1997). Pese a que las diarreas agudas debidas a ECET se asocian a condiciones higiénico-sanitarias deficientes, propias de los países del tercer mundo, en los últimos años se han presentado brotes en países industrializados como Japón (Nishikawa *et al.*, 1998; Mitsuda *et al.*, 1998) y Estados Unidos (Roels *et al.*, 1998).

En países como Estados Unidos, Canadá y Reino Unido, entre otros, el serotipo el O 157: H7, de esta especie, ha causado en los últimos tiempos un cuadro enterohemorrágico en humanos que puede ser fatal, sobre todo en niños y ancianos, cuando transita a síndrome urémico hemolítico (SUH). En esos países constituye la principal causa de diarrea sanguinolenta (15-41%) y el segundo o tercer patógeno, después de *Salmonella* y *Campylobacter* (Will 1995 a,b; Blanco *et al.*, 1995; Barreto y Benítez, 2000) A esta variedad, que incluye un número amplio de serotipos se le ha denominado *E coli* enterohemorrágica (ECHE) y es causa de zoonosis, por cuanto en la mayoría de los estudios desarrollados, entre otras causas, se ha asociado al consumo de alimentos de origen bovino con deficiente cocción. (Blanco y Blanco, 1993) y de otras especies (Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis-INPPAZ, 1996; Takeda, 1997; Barreto *et al.*, 1998, 1999, 2000a). ECEH, al igual que ECET, necesita adherirse, para colonizar, en este caso, el intestino grueso; sólo así, es que puede provocar los cuadros clínicos mencionados (Barreto, 1997; Barreto *et al.*, 1998, 1999, 2000^a; Barreto y Benítez, 2000).

ECET constituye un problema semejante en la salud animal. Por sólo mencionar un ejemplo, las pérdidas debidas a esta entidad en cerdos neonatos y jóvenes, sobrepasa el millón de pesos anualmente en el país (Wong *et al.*, 1995, 1996).

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU) también constituyen un problema de salud a escala mundial. Anualmente en Estados Unidos entre seis y siete millones de personas son atendidos debido a esta enfermedad y más de 100 000 son hospitalizados por pielonefritis aguda (Johnson, 1991). Las ITU constituyen la forma más común de las etiologías extraintestinales ocasionadas por *E. coli* que, a su vez, es la principal causa de dicha enfermedad.

A más de 100 años de su descubrimiento *E. coli* figura entre los organismos vivos más estudiados y utilizados por el hombre. Pese a tan prolongada experiencia, inexplicablemente se mantiene entre los que con mayor impacto afectan su salud y la de un amplio rango de especies animales de indiscutible valor económico (Barreto, 1997; Barreto *et al.*, 1998).

Etiopatogenia de las Infecciones de los Tractos Urinario y Gastrointestinal

E. coli constituye la forma bacteriana bacilar, gram-negativa, anaerobia facultativa, predominante en la flora intestinal del hombre y los animales. Sin embargo, de acuerdo con la teoría de la patogenicidad, existen determinadas particularidades que posibilitan el que ciertas cepas de esta especie, en otro ecosistema, venzan los mecanismos de defensa que son necesarios para controlarlas, y minimicen la posible competencia de la microflora normal (Orskov y Orskov, 1985, 1992) como es el caso de las etiologías analizadas en esta revisión.

El proceso de infección en las ITU se ha demostrado que tiene lugar a partir de un prerrequisito esencial que es la adhesión bacteriana a receptores específicos del uroepitelio (Orskov y Orskov, 1992; Blanco *et al.*, 1992; Blanco y Blanco, 1993). Si este paso se interrumpe, con ello se interrumpen los sucesivos en los que se produce la colonización, con las consecuencias que caracterizan a cada cuadro etiológico particular. En las ITU, producidas por *E. coli*, es conocido que las bacterias se adhieren típicamente a células periuretrales y uroepiteliales. Estas cepas presentan apéndices de adhesión, denominados fimbrias, entre las que se encuentra el tipo P (*E. coli* P⁺). En el 70% de las pielonefritis agudas se aíslan cepas P⁺, mientras que en las bacteriurias asintomáticas sólo se presentan en un 28% (Brauner *et al.*, 1985, 1987; Johnson, 1991).

En el caso de las cepas asociadas a EDA ocurre algo similar que posibilita, pese al peristaltismo intestinal, colonizar el intestino delgado (Barreto *et al.*, 1993^a). Brinton (1959) fue indiscutiblemente quien

inauguró este campo. Él y sus seguidores demostraron que al igual que existía una relación antígeno-especie (Orskov y Orskov, 1992) algo similar ocurría entre los hospederos y el tipo de fimbria expresada por ECET. Así, los factores fibrilares presentes en las cepas patógenas al humano se designaron abreviadamente con la sigla CFA (Colonization Factor Antigen) y ya son varios los descritos (I-IV) aunque prevalecen los tipos CFA/I y CFA/II (Evans *et al.*, 1975, 1978; Blanco y Blanco, 1993; Blanco *et al.*, 1995; Barreto, 1997) sin que ello obedezca necesariamente a un comportamiento internacional (Barreto *et al.*, 2000d; 2001).

En el caso de los animales se analizarán sólo dos especies: bovino y porcino. En el primer caso, los mayores aislamientos de ECET portan fimbrias F5 (también denominadas K99) y F41. Cepas con estas características también se han reportado en ovejas diarreicas (Wray, 1984; Blanco y Blanco, 1993). Otros factores fibrilares de colonización reportados en cepas de *E. coli* de origen bovino son ATT25 (actualmente F17), CS31A y F165, entre otras (Blanco y Blanco, 1993).

En cerdos los cuadros de EDA más comunes tienen lugar durante la primera semana de vida y luego, en los que suceden al destete. La fimbria más común en ambos casos es F4 (inicialmente designada como K88) que tiene varios subtipos (Guinee y Jansen, 1979; Blanco y Blanco, 1993). Fimbrias de los tipos F5 y F6 (conocida como 987P) y F41 se han reportado en diarreas de neonatos, en tanto que el tipo F42 se aisló de cerdos con diarreas post-destete. Otros factores fibrilares presentes en ECET procedente de cerdos diarreicos son PCF141 y CS1541 (Wray, 1984; Barreto y Karadjov, 1985; Barreto, 1986, 1988; Djonje y Liven, 1988; Pernas *et al.*, 1989; Navarro *et al.*, 1989; Barreto *et al.*, 1991; Velazquez *et al.*, 1991; Blanco y Blanco, 1993; Wong *et al.*, 1995, 1996).

Las fimbrias o pelos (pilis), aunque no son un factor de virulencia exclusivo de *E. coli*, indiscutiblemente ha sido en esta especie en la que más se han investigado (Brinton, 1959; Blanco y Blanco, 1993) fundamentalmente en los tipos enterotoxigénicos y uropatógenos. Según diversos autores, debido a esta preferencia y afinidad específica por los receptores celulares de los tejidos del hospedero susceptible, es que las infecciones intestinales y extraintestinales ocasionadas por *E. coli* constituyen un serio problema en el ámbito mundial (Wray, 1984; Blanco y Blanco, 1993; Johnson, 1991; Barreto *et al.*, 1993^a; Barreto, 1997).

Opciones terapéuticas ante las infecciones de los tractos urinario y gastrointestinal

Durante años la principal opción terapéutica frente a estas etiologías ha sido la antibioterapia (Mediavilla *et al.*, 1997). El uso excesivo de la antibioterapia ha demostrado que no sólo afecta al patógeno, también puede influir negativamente en la microflora normal del organismo. Esta alteración, en muchos casos, crea condiciones para el

establecimiento y proliferación del propio patógeno o de otros microorganismos oportunistas. Además, se presenta el fenómeno de la resistencia microbiana, acerca del cual Mediavilla *et al.* (1997) plantean: **"Si se tiene en cuenta que el problema de la resistencia es el resultado de la capacidad innata de las bacterias de adaptarse al medio, esto no debería extrañarnos y además permite predecir que, por muy ingeniosos que seamos diseñando nuevos antimicrobianos, existen pocas posibilidades de evitar la aparición de gérmenes resistentes."** Luego agregan: **"Se están investigando nuevas alternativas a los antibióticos para la terapia antiinfecciosa, pero es más que probable que las bacterias acaben ganando también esta batalla. Por lo tanto, es más razonable actuar sobre el otro lado del problema, es decir, reducir la presión selectiva tan brutal que nosotros introducimos con el uso masivo de los antibióticos".**

Un motivo para la diseminación de los genes de resistencia radica en su localización frecuente en plásmidos, los cuales tienen la capacidad de transferirse de una cepa bacteriana a otra mediante el proceso de conjugación, mecanismo que incluso puede ocurrir entre bacterias de diferentes géneros (Carter, 1989; Mediavilla *et al.*, 1997; Barreto *et al.*, 2000b).

Por todo lo expuesto, interferir el proceso de adhesión fimbrial pudiera considerarse como una posibilidad tentadora en la terapéutica de las ITU y las EDA, ya que se podrían tratar desde otra perspectiva en la que, no necesariamente, se precisa eliminar el microorganismo mediante los mecanismos clásicos (bactericidas o bacteriostáticos); tan sólo basta anular esta ventaja adaptativa. Al respecto se han ensayado diversas variantes:

- Uso de concentraciones subletales de antibióticos (Padilla *et al.*, 1988, 1991; Barreto *et al.*, 1994)
- Métodos inmunológicos (Wray, 1984; Kaper y Levine, 1988; Johnson, 1991; Levine *et al.*, 1993; Idania Wong *et al.*, 1995, 1996)
- Empleo de extractos de plantas medicinales (Barreto *et al.*, 1993 a,b; 1995a; 1997; Barreto y Campal, 2001)

Empleo de concentraciones subletales de antibióticos

La capacidad adhesiva de *E. coli* fimbriadas al uroepitelio, a enterocitos y a determinados hematíes, se ve influenciada negativamente por su previa exposición a concentraciones subinhibitorias de agentes antimicrobianos como ampicilina, gentamicina, sulfonamidas, trimetoprina y tetraciclina; mientras que el ácido nalidixico, es capaz de incrementar dicha adhesión (Sandberg *et al.*, 1979; Sandborg-Eden *et al.*, 1979; Vosbeck *et al.*, 1979; 1982; Vainasen *et al.*,

1982; Hales y Amyes, 1985; Stenqvist *et al.*, 1987; Johnson, 1991; Barreto *et al.*, 1994).

El equipo de Padilla *et al.* (1988) reportó la posibilidad de utilizar la gentamicina en concentraciones subletales para inhibir la expresión de la fimbria P en *E. coli* uropatógena. Posteriormente fueron estudiadas las quinolonas frente a *Pseudomonas aeruginosa*, que no pertenece a *Enterobacteriaceae* pero también posee factores fimbriales de adhesión (Novile *et al.*, 1992). Barreto *et al.* (1994) utilizaron concentraciones subletales de gentamicina, cloranfenicol, kanamicina y estreptomycin para inhibir la expresión de K88ab, utilizando la cepa de referencia *E. coli* G7. El efecto inhibitorio constatado fue del 95%, 85%, 80% y 75%, respectivamente. Más adelante se pudo comprobar que, en sentido general, todos aquellos antibióticos bloqueadores de la síntesis proteica, al administrarlos en concentraciones subletales, inhibían la síntesis fimbrial, tanto en el caso de la fimbria P, como de los tipos K 88 y K99 (Padilla *et al.*, 1991; Barreto *et al.*, 1994) sin que en ello existiera la menor influencia del medio de cultivo (Barreto *et al.*, 1995^{a,b}).

La utilización de antibióticos en concentraciones subletales, además de inhibir la expresión fimbrial, posee otras ventajas entre las que se encuentra el reducir los efectos adversos presentes en las dosificaciones convencionales (ototóxicos, nefrotóxicos, etc.). Sin embargo, esta variante presenta una gran limitante: la posibilidad de generar antibiorresistencia, limitante que ha vetado su aplicación *in vivo*. Su aceptación o no, la define la relación beneficio/riesgo, aspecto que ha acompañado a la aplicación *in vivo* de los antimicrobianos hasta la fecha. Si se tiene en cuenta lo planteado por Perfect (1996) ésta, realmente, no es la mejor opción a seguir, máxime si la posibilidad de inducir antibiorresistencia es aún mayor que la generada por estos fármacos cuando se aplican en las dosis normales (Barreto *et al.*, 2000).

Métodos inmunológicos: vacunas e inmunosueros.

Tanto en ECET como en las cepas productoras de ITU, independientemente de las diferencias de genotipo existentes, el proceso de infección tiene lugar a partir de ese paso imprescindible que es la adhesión bacteriana a receptores específicos de la mucosa intestinal o del uroepitelio (Orskov y Orskov, 1992; Blanco y Blanco, 1993; Barreto *et al.*, 1993^a; 2000b,c; 2001; Barreto y Campal, 2001). Esta adhesión, en el caso de las cepas uropatógenas portadoras de fimbria P, tiene lugar entre regiones terminales de estas adhesinas (subunidades PapG y PapF) y los receptores de carbohidratos α -D-Gal-(1-4)- β -D-Gal (llamados receptores Gal-Gal) que están ubicados en las células del uroepitelio (Johnson, 1991). Los receptores de CFA/I, la fimbria más generalizada en ECET aislados de humanos, son glicoconjugados que contienen ácido siálico, como es el caso del gangliósido GM2 (Wennerås *et al.*, 1990). Sin embargo, las sialoglicoproteínas también pueden enlazar la fimbria CFA/I (Neeser *et al.*, 1988).

Pieroni *et al.* (1988) aislaron una sialoglicoproteína de 26 kDa a partir de extractos de membrana de eritrocitos humanos que se une a bacterias portadoras de CFA/I y no a variantes CFA/TLa adición de CFA/I purificada reduce el enlace de las proteínas a bacterias CFA/I⁺. Aparentemente, CS1, CS2, CS3 y CS4 se unen al sialogangliósido GM1 (Oro *et al.*, 1990; Mol y Oudega, 1996). Los receptores para K88 no están perfectamente definidos. Existen resultados contradictorios en los que se alude a glicoproteínas, en unos, y a glicolípidos, en otros. Lo cierto es que el disacárido Gal α (1-3)Gal constituye una parte significativa de este receptor (Mol y Oudega, 1996) y que biopreparados elaborados a partir de corteza de *Eucalyptus* sp., y otros extractos de plantas, que se discutirán más adelante, pueden alterar esta adhesión (Barreto *et al.*, 1993^{a,c}; 1995^a; 1997; 2001^{a,b}; Guerra *et al.*, 1995; Prieto *et al.*, 1995; Barreto y Campal, 2001).

En eritrocitos y células uroepiteliales de primates (*Maccaca mulata*, *M. fascicularis*) se han encontrado receptores para fimbrias P (Svenson *et al.*, 1984). En una experiencia en la que se administró, a través de la uretra, soluciones con *E. coli* P⁺ con suspensiones ricas en residuos Gal-Gal, se redujo la uretritis, respecto al grupo que recibió sólo la bacteria. Los resultados de esta experiencia sentaron las bases para estudios en los que, utilizando estos receptores junto a seroalbúminas bovinas para incrementar su poder antigénico, fueron sintetizados anticuerpos monoclonales (AcM) contra éstos. Posteriormente, los mismos fueron inoculados en una especie heteróloga (*M. fascicularis*) para obtener anticuerpos antiidiotípicos que, mediante su arquitectura espacial, mimetizaran a los receptores Gal-Gal. Este estudio demostró que competían con los verdaderos receptores Gal-Gal al inocular *E. coli* P⁺ en los monos del grupo experimental, que no sufrieron daños renales (Kaack *et al.*, 1993).

Esta línea enfoca el fenómeno de la adhesión fimbrial al nivel molecular, lo cual es una opción casi exclusiva de centros de investigación de alto desarrollo tecnológico. En este sentido, otra variante más halagüeña ha sido la elaboración de vacunas contra *E. coli* P⁺ para tratar las ITU. Este camino, muy investigado en los '90, ha encontrado como inconvenientes la diversidad antigénica de esta familia de fimbrias y el hecho de que en las vías altas y bajas de este tracto participen muy diversos atributos de adhesión, algunos incluso no fibrilares. En las pielonefritis la fimbria P constituye el principal factor de colonización (Johnson, 1991; Johnson y Berggren, 1994). Su presencia se ha determinado en la mayoría de los estudios clínicos, y mediante el cultivo de los microorganismos aislados en medios agarizados; también se ha establecido mediante aglutinación del receptor e in-

munofluorescencia. Sin embargo, en las cistitis y bacteriurias su presentación es baja (Johnson, 1991; Johnson y Berggren, 1994).

La organización genética general de las fimbrias P de diferentes cepas es prácticamente idéntica (Johnson, 1991) y aunque son heterogéneas respecto al tamaño de las subunidades y a sus características antigénicas (Pere *et al.*, 1988) la principal subunidad fimbrial, Pap A, es antigénicamente dominante. Esta subunidad posee, en las diferentes serovariantes, un alto grado de homología aminoácida en los extremos amino y carboxilo terminales, por lo que constituye la opción más adecuada para una posible vacuna. Sin embargo, Pap A no está relacionada con la adhesión (Johnson, 1991; Johnson y Berggren, 1994; Barreto y Campal, 2001).

En lo referente a ECET, su prevención mediante el desarrollo de preparados vacunales se ha limitado a la esfera veterinaria. Las vacunas elaboradas han sido muy diversas y comprenden desde biopreparados que contienen cepas atenuadas, extractos semipurificados de antígenos pertenecientes a cepas circulantes en una región dada, hasta las obtenidas mediante tecnología del ADN recombinante (Jayappa *et al.*, 1984; Kaper y Levine, 1988; Levine *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1995, 1996). Estas últimas, entre las que se encuentran las que utilizan subunidades fimbriales, poseen toda una serie de ventajas con respecto a las convencionales, como son: la carencia de otros componentes celulares que no contribuyen a una respuesta protectora, así como de otras, como las endotoxinas, que inducen **shock**, alteraciones en la permeabilidad vascular y aborto en las hembras gestantes (Kaper y Levine, 1988; Levine *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1995). Una de estas vacunas, VACOLI, mediante su administración a cerdas gestantes, ha contribuido a una protección del 93 % en crías y a un 98 % en la etapa postdestete (Wong *et al.*, 1995, 1996).

A pesar de los éxitos obtenidos en este sentido, los estudios sobre ECET de interés veterinario también han puesto de manifiesto que los anticuerpos desarrollados, luego de la vacunación de hembras gestantes y dirigidos contra fimbrias específicas, pueden prevenir la adhesión bacteriana y las diarreas en los recién nacidos, siempre que las cepas circulantes presenten dichas adhesinas. Sin embargo, la amplia diversidad de fimbrias a expresar por ECET, de una parte, y la presión selectiva ejercida por estas vacunaciones, han conllevado al predominio de ECET con fenotipos fimbriales no contemplados en los biopreparados vacunales (Basulto, 2001; comunicación personal). Otro elemento de interés, fruto de las investigaciones desarrolladas, es que la amplia diversidad de fimbrias contempladas en la serie de vacunas desarrolladas, no se encuentran expresadas con igual frecuencia en las ECET de diferentes áreas endémicas. Así, las ECET 987P⁺ se presentan con mayor frecuencia en Estados Unidos que en Europa (Moon y Bunn, 1993). En Cuba

este comportamiento no ha sido estable (Barreto y Karadjov, 1985; Barreto, 1986, 1988; Berta Velázquez *et al.*, 1991).

En las ECET que afectan a humanos la diversidad de estas adhesinas fimbriales tal vez sea superior a la presente en las aisladas de animales. Los numerosos estudios epidemiológicos realizados han demostrado que la frecuencia de su expresión, en muchos casos, está influenciada por las diferentes áreas geográficas (Binztein *et al.*, 1991). En Tailandia y Bangladesh, dos de las áreas más afectadas por EDA en el planeta, prevalecen ECET CFA/I⁺, en tanto que cepas del tipo CFA/IV⁺ se aíslan como excepción. En México, sin embargo, no hay diferencias en cuanto a su presentación (Svennerholm *et al.*, 1989; Svennerholm, 1991). En Camagüey, Cuba, no son frecuentes cepas con fenotipos CFA/I y/o CFA/II (Barreto, 1997; Barreto *et al.*, 1999; 2000^{a,d}; 2001; Barreto y Campal, 2001).

Estas situaciones, y tal vez el hecho de que las EDA, en lo que al humano concierne, se consideran un problema del denominado Tercer Mundo, han limitado el desarrollo de vacunas que indiscutiblemente contribuirían a reducir la alta mortalidad anual en estos países (Barreto, 1997; Barreto *et al.*, 1998; Barreto y Benítez, 2000).

Con respecto al campo veterinario, pese al gran número de vacunas recombinantes obtenidas para la prevención contra ECET fimbriadas, en algunos países desarrollados, a partir de los 90^o, ha habido una tendencia a no utilizarlas y, en su lugar, aplicar la denominada "exposición intencional" (Otto, 1991; Mason, 1995).

Los inmunosueros, polivalentes y monovalentes, también han sido utilizados para el control de diarreas provocadas por ECET en animales, fundamentalmente en terneros. Pese a ello, su uso no ha tenido la aceptación y difusión de las vacunas ya analizadas (Trainin *et al.*, 1981; Sherman *et al.*, 1993).

Efecto de extractos vegetales sobre la interacción fimbria-receptor.

La utilización de plantas medicinales, algunas de ellas con un aval de siglos en su uso tradicional, responde a una tendencia actual en los países desarrollados. La identificación de principios activos presentes en las mismas posibilita el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas más efectivas a las utilizadas en la terapia actual y permite el establecimiento de mecanismos de acción que justifican su acción terapéutica en las etiologías infecciosas (Abreu y Barreto, 1999).

En Europa y Norteamérica es muy común la utilización de *Vaccinium myrtillus* y *V. macrocarpon* Ait por su actividad sobre el Sistema Urinario. De esta última especie existen referencias sobre su acción en la interacción fimbrial de *E. coli* en ITU, tanto *in vitro* como *in vivo* (Sobota, 1984; Soloway, 1988; Schi-

midt y Sobota, 1989; Zafriri *et al.*, 1989; Fox, 1989; Avorn *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1997; Ahuja *et al.*, 1998; Mediherb, 1999; Foo *et al.*, 2000a, b).

En Cuba los primeros reportes sobre el uso de extractos de plantas con relación al fenómeno de la adhesión fimbrial están relacionados a estudios efectuados al Eucabev, producto antidiarreico elaborado a partir de corteza de *Eucalyptus*. El mismo se enfrentó a las cepas de referencia G7 (08 K87, K88ab) y B44 (09 K30, K99) (Barreto *et al.*, 1993a,b;1995a) luego de que decocciones del producto se utilizaran con éxito en el tratamiento de las diarreas agudas en diferentes especies animales y el humano (Bertha Velázquez *et al.*, 1991) y que, en estudios microbiológicos, se comprobara que a las concentraciones utilizadas, el Eucabev carecía de acción bactericida o bacteriostática sobre ECET (Barreto *et al.*, 1993c). El modelo experimental utilizado era muy sencillo. Consistía en someter a las cepas fimbriadas a tres pases sucesivos, dos por medio de cultivo líquido y uno final en el mismo medio, pero agarizado. El tipo de medio empleado, la temperatura de incubación y los tiempos entre cada pase estaban en dependencia de las condiciones óptimas para la expresión fenotípica de cada fimbria en particular. La presencia, o ausencia, de las mismas se confirmaba a partir del crecimiento en el medio agarizado, mediante la utilización de inmunosueros antifimbriales, o suspensiones de hematíes con receptores específicos para las mismas. En los grupos experimentales, a los medios de cultivo se les sustituía un volumen de agua destilada por otro equivalente del extracto estéril a evaluar.

La inhibición de los factores K88ab y K99 (83,3% y 100%) luego del enfrentamiento a los extractos de *Eucalyptus* fue significativa ($P < 0,05$). En el primer caso, la ausencia de fimbrias en las réplicas efectuadas fue el resultado de una combinación de modificaciones (46,15%) con variaciones genotípicas (53,8%). En los ensayos con la cepa B44 la inhibición genotípica de K99 (85%) prevaleció (Barreto *et al.*, 1993^a). En este ensayo, al igual que en otro posterior (Barreto *et al.*, 1995a) existía un punto débil, la aparición de variantes autoaglutinantes luego de los pases por los medios con algunos extractos. Los fenómenos de autoaglutinaciones se produjeron fundamentalmente en las réplicas efectuadas a la cepa G7. Este elemento enmascarador, dada la carencia de un microscopio electrónico, sembró la duda al respecto de si la fimbria K88ab se perdía o no. En ambos trabajos se utilizaron inmunosueros polivalentes anti-K88. Dada la mayor estabilidad de esta fimbria (Barreto *et al.* 1993^a) era muy probable que persistiera luego de los tratamientos frente a *E. saligna* y *E. citriodora*. Algo si había quedado claro, el bloqueo de la expresión fimbrial estaba relacionado con la especie de *Eucalyptus* y la concentración de los extractos elaborados.

Ante la imposibilidad de aplicar técnicas de microscopía electrónica se diseñó un nuevo modelo en el que la

presencia de K88ab se evaluó en paralelo con dos indicadores: un inmunosuero monoclonal 11/70 anti-K88ab y una suspensión de hematies A en solución salina buferada (1:4) a pH 7,2 (Blanco y Blanco, 1993). El primero detectaba la subunidad predominante de la fimbria K88; mediante hemoaglutinación manosa-resistente (HAMR) se establecía la porción adhesiva de dicha fimbria. Con este sencillo esquema se pudo comprobar que en todas las variantes auto-aglutinantes investigadas se había perdido la fimbria. Esto es, se lograba el bloqueo de la expresión fimbrial de K88ab luego del enfrentamiento de G7 a medios con concentraciones subletales de *E. saligna* y *E. citriodora* (Barreto y Campal, 2001). Todos los extractos que afectaban la expresión de K88ab tenían un efecto similar sobre CFA/I, la fimbria más frecuente en ECET asociadas a EDA en humanos. Este trabajo estableció, además, que la acción sobre la viabilidad bacteriana dependía de la especie de *Eucalyptus*, la concentración de los extractos y la especie o variedad bacteriana analizada. La tabla 1 resume los principales efectos de estas dos especies de *Eucalyptus* sobre *E. coli* G7.

A *Achirantes aspera* se le atribuyen las más diversas propiedades terapéuticas. Se ha reportado el uso de decocciones de esta planta para dolores abdominales y, asociado al bicarbonato de sodio, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Sus hojas se utilizan en diversas partes del planeta para combatir las diarreas. Los extractos acuosos de las partes aéreas reducen significativamente la hipersecreción inducida por la toxina colérica en el intestino de ratones. El jugo de la planta entera se ha utilizado en casos de disentería (Roig, 1974; Sing y Anwar-Ali, 1989; Samuelson *et al.*, 1991). A los extractos de hojas secas y semillas, realizados con hexano, se les ha atribuido una débil acción bactericida (Ikram y Haq, 1988) en tanto que a los extractos clorofórmicos de semilla se les confiere un efecto bactericida sobre *E. coli* (Samuelson *et al.*, 1991). Se ha reportado que las tinturas (menstruo al 70%) de hojas, tallos, semillas y de toda la planta, poseen efecto bactericida frente a cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (K88ab⁺) y uropatógenas (P⁺). Sin embargo, en ese mismo estudio ninguna decocción presentó acción antibacteriana ante dichas cepas (Guerra *et al.*, 1995). La población, de forma tradicional, utiliza esta planta para el tratamiento de las EDA e ITU en forma de infusiones, decocciones y extractos acuosos. En el trabajo de Guerra *et al.* (1995) muy sencillo, y sin el rigor de los desarrollados con *Eucalyptus*, se pudo constatar un efecto inhibidor de la expresión fimbrial con las decocciones de hojas. Estos resultados fueron confirmados posteriormente en una experiencia similar (Barreto *et al.*, 1997).

Entre las plantas más utilizadas por la población para el tratamiento de las afecciones renales figuran: *Lepidium virginicum* L., *Xanthium occidentale* Bertol y *A. aspera* (Roig, 1974; Sing y Anwar-Ali, 1989; Fitomed II, 1993; Abreu y Barreto, 1999). Estudios preliminares con cepas de *E. coli* P⁺ demostraron que las decocciones de estas plantas carecían por completo de efectos bactericidas o bacteriostáticos aunque, de forma variable, afectaban la expresión fimbrial (Guerra *et al.*, 1995; Prieto *et al.*, 1995 y Barreto *et al.*, 1997). Estos ensayos, aunque interesantes por sus resultados, no contaron con la presencia de cepas de referencia y la expresión o ausencia de fimbrias P se estableció mediante HAMR (Blanco y Blanco, 1993). Los receptores Gal-Gal a nivel de eritrocitos, al igual que los presentes en el uroepitelio, reconocen las subunidades PapG y PapF, que sólo se adhieren a ellos cuando PapE también se ha expresado. Papa A, la subunidad hegemónica, no se relaciona con la adhesión (Jonson, 1991). En estos ensayos es posible que se hayan producido alteraciones en la arquitectura fimbrial no apreciables por las limitaciones del sistema utilizado. Teniendo en cuenta estas premisas, se procedió a una nueva experiencia (Barreto *et al.*, 2000c) en la que se incorporó un inmunosuero anti-PapA. El mismo se utilizó en paralelo al ensayo de HAMR (Blanco y Blanco, 1993). Con el auxilio de la cepa de referencia *E. coli* ATCC25922 (P⁺) se efectuó un tamizaje para evaluar el bloqueo de la adhesión fimbrial a decocciones y tinturas elaboradas a partir de *A. aspera*, *Lepidium virginicum* L., *Ageratum conyzoides* L., *Zingiber officinale* Rosc., *Curcuma longa* L y *Costus speciosus* Smith. Sólo en el caso de *C. longa* no se inhibió la expresión fimbrial en ninguna de las variantes ensayadas. En una experiencia anterior se había demostrado otra forma de bloquear la adhesión y fue cuando, en lugar de enfrentar la cepa bacteriana a extractos de plantas, los mismos se aplicaron a las células portadoras de los receptores para fimbrias (Barreto *et al.*, 1993c). Aunque en esa ocasión se trataba de receptores para K99, algo similar podía ocurrir con Gal-Gal. La realización de esta variante puso de manifiesto que varios de los extractos investigados, incluyendo la decocción de *C. longa*, bloqueaban dichos receptores y por ende, impedían la adhesión de *E. coli* P⁺. Los resultados de estas dos experiencias se resumen en la tabla 2.

Un equipo de investigadores norteamericanos ha reportado la inhibición irreversible de la fimbria P luego de efectuar dos pases sucesivos a la cepa JR1 en agar CFA con jugo del fruto de *V. macrocarpon* al 25% (Ahuja *et al.*, 1998). Microfotografías realizadas demuestran la pérdida total de la fimbria P en las preparaciones elaboradas. Los autores concluyen que estos resultados podían deberse a un desprendimiento de las fimbrias o a una inhibición en su expresión. Los resultados obtenidos con la cepa *E. coli* ATCC25922 (Barreto *et al.*, 2000c) apoyan la segunda interpretación, máxime si se tiene en cuen-

ta, además, los resultados obtenidos al enfrentar a *E. coli* G7 con extractos diversos de *Eucalyptus* sp. (Barreto y Campal, 2001). Como ya se ha expuesto, en experiencias anteriores se demostró que este bloqueo, en algunos casos, obedecía a la persistencia del inhibidor en el medio, en otras, sin embargo, se perdía la capacidad de expresar las fimbrias aún cuando se realizaran subcultivos en medios libres del inhibidor. Estos resultados estaban determinados por la especie de planta utilizada y la clase de fimbria en cuestión (Barreto *et al.*, 1993a, 1995^{a,b}, 1997; Barreto y Campal, 2001).

Estos efectos bloqueadores de la adhesión pueden estar relacionados con diferentes efectos por parte de los extractos. Podrían estar asociados a metabolitos presentes en estas plantas que actúen como represores de los genes relacionados con las subunidades estructurales fimbriales o con los codificadores de las enzimas y proteínas asociadas a su transporte y fijación en la superficie celular. Pueden intervenir mecanismos similares a los descritos para determinados antibacterianos ensayados a concentraciones subletales (Padilla *et al.*, 1991; Barreto *et al.*, 1994). Los genes *pap* no se encuentran aislados. En muchas cepas de *E. coli* uropatógenas se han visto asociados a otros genes codificadores de factores de virulencia como es el caso de las hemolisinas y otros tipos de adhesinas (Oto *et al.*, 1991). A esta asociación de genes se les conoce con el término de "islas de patogenicidad" (Lee, 1996) que tienden a sufrir deleciones espontáneas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Hacker *et al.*, 1990). Estas deleciones pueden afectar algunos genes codificadores de Pap D, por ejemplo, que al nivel de los espacios periplasmáticos tiene la función de estabilizar las subunidades estructurales fimbriales durante su translocación hacia la membrana externa. Podría influir en Pap C, que participa en el transporte de estas subunidades y su ensamblaje (Johnson, 1991). Cualquiera sea la deleción, si esto sucediera, dada la adhesión demostrada siempre en los controles, es señal de que los metabolitos (o metabolito) de estas plantas ejercen una acción mutagénica, aspecto que se debe considerar en ulteriores estudios de teratogenicidad.

Otro mecanismo que pudiera considerarse es la posible acción bloqueadora de los compuestos vegetales activos sobre el complejo de adhesión fimbrial. Estos compuestos pueden causar una interferencia de la adhesión mediante su unión a los receptores, o a un sitio próximo, de forma tal que hagan imposible, estéricamente, la interacción con los elementos de adhesión fimbrial. También es posible la existencia de análogos a los receptores celulares que compitan por la correspondiente fimbria. Se trata, al parecer, de toda una gama de variantes aún por demostrar.

La interferencia de la interacción fimbria-receptor de los extractos vegetales no deberá provocar resistencia ya que los microorganismos no se ven expuestos a una presión de selección capaz de desarrollar este fenómeno. Se trata, especulativamente hablando, de competencias por un receptor, en algunos casos, o de interferencias en la expresión fimbrial, en otros. La experiencia popular pone de manifiesto que estos tratamientos, sobre todo en el caso de los pacientes crónicos, requieren del consumo de dichos extractos por períodos prolongados, incluso de por vida. A diferencia de los antibacterianos convencionales, que ejercen su efecto sobre el patógeno a eliminar, y además sobre el resto de los componentes de la flora no patógena sensible, la variante analizada actúa sobre los factores de virulencia del patógeno, por lo que no debe causar alteraciones en la biota normal. La persistencia en esta opción garantiza que los receptores específicos para patógenos estén bloqueados. Los tratamientos prolongados con antibacterianos convencionales, sin embargo, propician las condiciones para el surgimiento de nuevas patologías en los pacientes tratados, como es el caso de la Candidiasis o la Disbacteriosis del colon.

Como se aprecia, muchos pueden ser los factores que afectan la interacción necesaria para que tenga lugar la adhesión de *E. coli* uropatógena o enterotoxigénica y se desarrollen estados patológicos que puedan afectar tanto a animales como al hombre. En las plantas estudiadas hasta el momento se han detectado flavonoides, quinonas y taninos, su papel en la inhibición fimbrial aún está por demostrar, así como está por demostrar también el posible rol de análogos estructurales que, por simple competencia, interfieran en esta unión. Aunque se trata de resultados *in vitro*, constituyen las primeras posibles respuestas al por qué toda una gama de plantas empleadas tradicionalmente, y que carecen de una acción bactericida o bacteriostática pronunciada, tiene efecto terapéutico en el tratamiento de las ITU y EDA.

Según los naturistas el hombre es un frugívoro que, al tratar de comportarse como carnívoro, ha dañado su salud y limitado su esperanza natural de vida. Esta aseveración, al margen de los efectos tóxicos de las dietas criticadas, muy bien puede estar relacionada con la presencia en nuestro organismo de toda una serie de receptores para los patógenos más diversos que, si se consumieran frutas, vegetales, etc., quedarían bloqueados como ha ocurrido en los resultados resumidos anteriormente. Esto, por supuesto, es sólo una hipótesis más y su demostración, un gran reto que vale la pena aceptar.

REFERENCIAS

- AGÜERO, M.E., REYES, L., PRADO, V., ORSKOV, I., ORSKOV, F. y FC. CABELLO. ETEC in a population of infants in Chile. J. Clin. Microbiol. 22: 576, 1985.

- AHUJA, S., KAACK, B. y J. ROBERTS. Loss of fimbrial adhesion with the addition of *Vaccinum* macrocarpon to the growth medium of P-fimbriated *Escherichia coli*. J. Urol. 159 (2): 559-562, 1998.
- AVORN, J., MONANE, M., GURWITZ, JH., GLYNN, R.J., CHOODNOVSKIY, I. y LA. LIPSITZ. Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. JAMA. 271: 751-754, 1994.
- BARRETO, G. y J. KARADJOV. Estudio ecológico sobre cepas de *E. coli* aisladas de cerdos diarreicos en tres unidades porcinas en la Provincia de Camagüey. Revista de Producción Animal. 1 (3): 63-70, 1985.
- BARRETO, G. Estudio comparativo del agente causal de la colibacteriosis en cerdos en Bulgaria y Cuba, con vistas su terapia y profilaxis. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto Superior de Zootecnia y Medicina Veterinaria de Stara Zagora, Bulgaria, 1986.
- BARRETO, G. Factores de adhesión en *E. coli* mediante cuatro métodos de diagnóstico. Rev. Prod. Animal. 4 (3): 209-213, 1988.
- BARRETO, G., CASTELLANOS, L., NAVARRO, LM. y H. RODRÍGUEZ. Diagnóstico de *E. coli* enterotoxigénico en terneros diarreicos menores de 40 días. Rev. Prod. Animal. 6(2): 151-156, 1991.
- BARRETO, G., LEZCANO, Y., RAMOS, O., VELAZQUEZ, B., MORENO, M. y G. PARDO. Efecto de un medicamento a base de eucalipto (EUCABEV) sobre la producción de los factores de colonización F4 y F5 de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Rev. Prod. Anim. 7 (1 y 2): 73-76, 1993a.
- BARRETO, G., VELAZQUEZ, B., MORENO, M., RAMOS, O., LEZCANO, Y. y H. RODRÍGUEZ. Efecto de un medicamento a base de eucalipto (Eucabev) sobre los receptores para F5 de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Rev. Prod. Anim. 7(3): 135-136, 1993b.
- BARRETO, G., RAMOS, O., LEZCANO, Y., VELAZQUEZ, B., MORENO, M., y G. PARDO. Efecto bactericida o bacteriostático de un medicamento a base de eucalipto (Eucabev). Rev. Prod. Anim. 7 (1 y 2): 69-71, 1993c.
- BARRETO G., MARTÍN M., PARDO, G. y M. PAZOS. Efecto de concentraciones subletales de antibióticos en la expresión del factor de colonización F4. Revista de Producción Animal. 8 (1): 61-3, 1994.
- BARRETO, G., PAZOS, M., MARTÍN, M., DIAZ, S. y B. VELÁSQUEZ. Acción de extractos de *E. sa-ligna* y *E. citriodora* sobre el factor de colonización F4. Revista de Producción Animal. 9 (1): 68-79, 1995a.
- BARRETO, G., JIMÉNEZ, O., PRIETO, M., GUERRA, A. y G. GUEVARA. Expresión fimbrial (F4 y P) de *E. coli* en medios convencionales. Rev. Prod. Anim. 9: 83-87, 1995b.
- BARRETO G. *E. coli* un reto tras 111 años de estudio. Archivo Médico de Camagüey 1(1), 1997. [Publicación Electrónica].
- BARRETO, G., ALONSO, K., ESTÉVEZ, M. y O. JIMÉNEZ. Efectos de los extractos de *Achyranthes aspera* sobre *E. coli*. Revista Referativa Electrónica Archivo Médico de Camagüey. 2 (3), 1997. [Publicación Electrónica].
- BARRETO G., JIMENEZ, O. y S. DIAZ. *E. coli* verotoxigénico (VTEC): una nueva variedad, un nuevo riesgo. Revista de Producción Animal. 10 (anuario): 5-26, 1997-1998.
- BARRETO, G., SEDRÉS, M., ORTIZ, A. y M. RICARDO. Esquema para el diagnóstico de *E. coli* enterohemorrágico y otras categorías enteropatógenas a partir de alimentos. Revista de Producción Animal. 11 (anuario): 39-43, 1999.
- BARRETO, G., SEDRÉS, M., ORTIZ, A. y M. RICARDO. Categorías enteropatógenas de *E. coli* en alimentos. Rev. Prod. Anim. 12: 87-90, 2000a.
- BARRETO, G., GANDARILLA, B., LORET DE MOLA, ME. y B. RODRÍGUEZ. Microbiología Farmacéutica. Universidad de Camagüey. p. 154-157, 221-222. Camagüey, 2000b.
- BARRETO, G., ABREU, O., ROJAS, Y. y A. CAMPAL. Tamizaje microbiológico a plantas medicinales bloqueadoras de la adhesión de *E. coli* uropatógena P⁺ presentes en Cuba.. XIV Forum de Ciencia y Técnica. 25 de Octubre. Camagüey, 2000c.
- BARRETO, G., HERNÁNDEZ, RI., ORTIZ, A. y Y. SANTIAGO. Esquema para el diagnóstico de ECEH y otras categorías enteropatógenas de *E. coli* a partir de pacientes de EDA. Archivo Médico de Camagüey. 5 (1), 2000d. [Publicación electrónica].
- BARRETO G. y T. BENÍTEZ. *E. coli* enterohemorrágico (ECHE). Algunas consecuencias de su presentación en el humano. Archivo Médico de Camagüey; 4(2), 2000. [Publicación Electrónica].
- BARRETO, G. y A. CAMPAL. Efecto de extractos de *Eucalyptus saligna* y *Eucalyptus citriodora* sobre la viabilidad y expresión fimbrial (K88y CFA/I) de *E. coli* enterotoxigénica. Rev. Prod. Anim. 13: 2001 (en prensa).
- BARRETO, G., HERNÁNDEZ, RI., ORTIZ, A. y Y. SANTIAGO. Presencia de *E. coli* enteropatógenas en pacientes con diarrea aguda. Archivo Médico de Camagüey. 5(2): 2001. [Publicación electrónica].

- BASULTO, R. Investigador Auxiliar y Director del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Camagüey.
- BINZTEIN, N., JOWE, MJ., BIVOUD, GI., LÓPEZ, L., RIVAS, M., ORSKOV, I., AHVEN, C. y AM. SVENNERHOLM. Colonization factors of ETEC isolated from children with diarrhea in Argentina. J. Clin. Microbiol. 25: 1893, 1991.
- BLACK, R. Epidemiology of diarrheal disease: implications for vaccines control. Vaccine. 11: 1000, 1993.
- BLANCO, J., ALONSO, MP., BLANCO, M., BLANCO, JE., GONZÁLEZ, EA., y JI. GARABAL. Establishment of three categories of P fimbriated *E. coli* strains that show different toxic phenotypes and belong to particular O serogroups. FEMS Microbiology Letters. 99: 131-136, 1992.
- BLANCO, J. y M. BLANCO. ETEC, NCEC y VTEC de origen humano y bovino, Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Servicio de Publicaciones Diputación Provincial San Marcos. p. 35-48, 71-77, 104-107, 115-120, 173-176, 207-209, 235-239, 306-308, 310-316. Galicia, 1993.
- BLANCO, JE., BLANCO, M. y J. BLANCO. ETEC, VTEC en alimentos y muestras clínicas. Papel de los animales como reservorios de cepas patógenas para el hombre. Microbiología SEM 11:97-110, 1995.
- BRAUNER, A., LEISSNER, B., WRETLIND, B., JULANDRE, I., SVENSON, SB. y G. KALLENIOUS. Occurrence of *Escherichia coli* in patients with bacteremia. Eur. J. Clin. Microbiol. 4: 566-569, 1985.
- BRAUNER, A., BOEUFGRAS, JM., JACOBSON, SH., KAIJSER, B., KALLENIOUS, G., SVENSON, SB. y B. WRETLIND. The use of biochemical markers, serotype and fimbriation in the detection of *Escherichia coli* clones. J. Gen. Microbiol. 133: 2825-2834, 1987.
- BRINTON, CC. Non-flagellar appendages of bacteria. Nature. 183: 782-786, 1959.
- CARTER, GR.. Bacteriología y Micología Veterinaria. Acribia, SA. p. 395. España, 1989.
- DJONNE, R. y E. LIVEN. Fimbriae in *E. coli* isolated from the small intestine of piglets. Acta Veterinaria Scandinavica. 27: 235-242, 1988.
- EVANS, DG., SILVER, RP., EVANS, DJ., CHASE, DG. y SL. GABACH. Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in *E. coli* enterotoxigenic for humans. Infect. Immun. 21: 656-667, 1975.
- EVANS, DG., y DJ. EVANS. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *E. coli* serogroups 06 and 08. Infect. Immun. 21: 638-647, 1978.
- FITOMED II. Plantas medicinales Editorial Ciencia Médicas MINSAP. p. 60-61, 78-79, 116-117. La Habana, 1993.
- FOO, LY., LU, Y., HOWELL, AB. y N. VORSA. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. J. Nat. Prod. 63 (9): 1225-1228, 2000a.
- FOO, LY., LU, Y., HOWELL, AB. y N. VORSA. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. Phytochemistry 54 (2): 173-181, 2000b.
- FOX, JL. Bacterial lectins and the Cranberry factor. ASM News 55 (12): 657, 1989.
- GUERRA, A., PÉREZ, S., BARRETO, G., PARDO, G. y G. GONZÁLEZ. Caracterización de cepas uropatógenas y entéricas: acción de extractos de *A. aspera*. Trabajo de Diploma. Facultad Química-Farmacia. Universidad de Camagüey, 1995.
- GUINEE, P. y W. HANSEN. Behavior of *E. coli* K antigens K88ab, K88ac, K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and hemagglutination. Infect. Immun. 23: 700-705, 1979.
- HACKER, J., BENDER, L., OTT, M., WINGENDER, J., LUND, B., MARRE, R. y W. GOEBEL. Deletion of chromosomal regions coding for fimbrial and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *E. coli* isolates. Microbial. Pathogenesis. 8: 213-225, 1990.
- HALES, BA. y SGB. AMYES. The effect of a range of antimicrobial drugs on the haemagglutination of two clinical isolates from urinary tract infection. J. Antimicrob. Chemother. 16: 671-674, 1985.
- IKRAM, M. y I. HAQ. Screening of medicinal plants for antimicrobial activity. Part I. Fitoterapia. 51: 231-235, 1988.
- INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE ALIMENTOS Y ZOONOSIS (INPPAZ). Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina y características socioeconómicas de sus vendedores y consumidores. ISBN 92 75 32220 3 p. 15-19, 37-38. INPPAZ. México, 1996.
- JAYAPPA, HG., STRAYER, JG. y RA. GOODNOW. Controlling colibacillosis in neonatal calves. 1. Evaluation of a multiple-pilus, multiple-capsular phase cloned *E. coli* bacterin. 2. Virulence and prevalence of *E. coli* bearing type 1 pili among isolates from neonatal calf diarrhoea. Veterinary Medicine and Small Animal Clinician. 79(3): 392-394, 1984.

- JOHNSON, JR.. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology Reviews. 4: 80-128, 1991.
- JOHNSON, JR. y T. BERGGREN. Pigeon and dove eggwhite protect mice against renal infections due to P fimbriated *E. coli*. The American Journal of Medical Sciences. 307: 335-339, 1994.
- KAACK, MB., SVENSON, LN., BASKIN, SB., STEELE, G y JA. ROBERTS. Protective anti-idiotypic antibodies in the primate model of pyelonephritis. Infect. Immun. 61: 2289-2295, 1993.
- KAPER, J.B. y MM. LEVINE. Progress toward a vaccine against ECET. Vaccine 6: 197-199, 1988.
- LEE, O. Pathogenicity island and evolution of bacterial pathogens. Infect. Agents Dis. 5: 1-7, 1996.
- LEVINE, MM., KAPER, JB., BLACK, R. y ML. CLEMENTS. New knowledge of pathogenesis of bacterial enteric infection as applied to vaccine development. Microbiol. Rev. 47: 510-520, 1993.
- MASON, D. Técnicas para la reproducción, los pastos y el destete que se usan en empresas porcinas de Iowa. Libro de discursos de la "Escuela Internacional de Agrotecnia en Cuba" 1985. Ed. M.E. Mesinger. Agriservices Foundation. 169-170. 1995.
- MEDIAVILLA, A., FLOREZ, J. y JM. GARCÍA-LOBO. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociación de antibióticos. En: Farmacología Humana. J. FLOREZ, J A. ARMIJO, A. MEDIAVILLA (Dir.) Ed. Masson S.A. p. 1061-1083. Barcelona, 1997.
- MEDIHERB. *Vaccinium macrocarpon*- Cranberry. Professional Review, 72: 1-4, 1999
- MITSUDA, T., MUTO, T., YAMADA, M., KOBAYASHI, N., TOBA, M., AIHARA, Y., ITO, A. y S. YOKOHAMA. epidemiological study of food-borne outbreak of ETEC O:25:NM by pulsed field gel electrophoresis and randomly amplified poly morphic ADN análisis. J. Clin. Microbiol. 36(3) : 652-656, 1998.
- MOL, O. y B. OUDEGA. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *E. coli*. FEMS Microbiol. Lett. 19: 25-52, 1996.
- MOON, HW. y TO. BUNN. Vaccines for preventing ETEC infections in farm animals. Vaccine. 11, 213, 1993.
- NAVARRO, LM., BARRETO, G. y A. DEL PINO. Valoración de la presencia de rotavirus, *E. coli* enteropatógenas y *Cryptosporidium* sp en terneros diarreicos. Rev. Prod. Animal. 5 (3): 233-238, 1989.
- NESSER, JR., CHAMBERS, A., HOANG, KY. y H. LINK-AMSTER. Screening for complex carbohydrates inhibiting hemagglutinations by CFA/I and CFA/II expressing ECET strains. FEMS. Microbiol. Lett. 49: 301, 1988.
- NISHIKAWA, Y., HELANDER, A., OGASAWARA, J., MOYER, NP., HANAOKA, M., HASE, A. y A. YAMKAWA. Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *E. coli* serotype O:189:H41. Epidemiol. Infect. 121 (1): 31-42, 1998.
- NOBILE, G., PUERTA, MJ., NOBILE, M. y BT. NOBILE. Efectos de concentraciones subletales de ciprofloxacina sobre adherencia de la *P. aureoginosa*. Rev. Lat-Amer. Microb. 34(3): 175-178, 1992.
- ORO, HS., KOLSTO, AB., WENEREAS, C. Y AM. SVENNERHOLM. Identification of a sialo GM1 as a binding structure for *E. coli* colonization factor antigens. FEMS Microbiol. Lett. 72: 289, 1990.
- ORSKOV, I. y J. ORSKOV. *E. coli* in extra-intestinal infections. J. Hyg. 95: 551-575, 1985.
- ORSKOV, F. y I. ORSKOV. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animal. Can. J. Microbiol. 38: 699-704, 1992.
- OTTO, K. Enfermedades del cerdo en explotación intensiva. Eimed. Ediciones Médicas. p. 8-10. Bilbao, 1991.
- PADILLA, C., BREVIS, P., ZENELMAN, R. y E. VIVALDI. Efecto de concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos sobre adherencia de *E. coli* fimbriada a células uroepiteliales. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 33: 5-9, 1988.
- PADILLA, C., VÁZQUEZ, M. y O. FAUNDEZ. Effects of minimum inhibitory concentrations of three antimicrobials on the growth cell and fimbriation of uropathogenic *E. coli*. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 33: 105-108, 1991.
- PERE, A., SELANDER, RK. y TK. CORONEN. Characterization of P fimbriae on O1, O7, O75 and nontypable strains of *E. coli*. Infect. Immun. 56: 1288-1294, 1988.
- PERFECT, JR. Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy. Antimicrob. Agents. Chemother. 40(7): 1577-1583, 1996.
- PERNAS, JL., PINO, D., BARRETO, G. y ME. LORET DE MOLA. Algunas consideraciones sobre cepas de *E. Coli* aisladas de cerdos diarreicos en unidades porcinas de la Provincia de Camaguey. Revista de Ciencia y técnica en la Agricultura . Serie Veterinaria. XX (X): 59-70, 1989.
- PIERONI, P., WOROBEK, GA., PARANCHIYCH, W. y GD. AMSTRONG. Identification of a human erythrocyte receptor for colonization factor antigen I pili expressed by H10407 ETEC. Infect. Immun. 56: 1334, 1988.
- PRIETO, M., JIMÉNEZ, O., BARRETO, G., PAZOS, M. y G. PARDO. Estudio de cepas uropatógenas: comportamiento fisiológico, efecto de extractos de

- Lepidium virginicum* L. Trabajo de Diploma. Universidad de Camagüey, 1995.
- ROELS, T., PROCTOR, M., ROBINSON, L., HULBERT, K., BOUP, C. y J. DAVIS. Clinical features of infections due to *E. coli* producing-heat stable toxin during outbreak in Wisconsin: a rarely suspected cause of diarrhea in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 26(4) : 898-902, 1998.
- ROIG, JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Ciencia y Técnica. p. 365-368. La Habana, 1974.
- SAMUELSON, G., FERAH, H., CLAESON, P., HAGOS, M., THULEN, M., HEDELBERG, O., WORFA, A., HASSAN, A., ELME, A., ABDURAHMAN, A., ABDI, Y. y M. AHIM. Inventory of plants used in traditional medicine in Somalia: I Plants of families Acanthaceae, Compositaceae. *Journal of Ethnopharmacology.* 35: 25-63, 1991.
- SANDBERG, T., STENQVIST, K. y C. SANDBORG EDEN. Effects of subminimal inhibitory concentrations of ampicillin, cloranfenicol, and nitrofurantoin on the attachment of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells in vitro. *Rev. Infect. Dis.* 1: 838-844, 1979.
- SANDBORG EDEN, C., SANDBERG, T., STENQVIST, K. y S. AHLSTEDT. Effects of subinhibitory amounts of ampicillin, amoxycillin, and mecillinam on the adhesion of *Escherichia coli* bacteria to human urinary tract epithelial cells: a preliminary study. *Infection.* 7 (Supl. 5): S452-S455, 1979.
- SCHIMDT, DR. y AE. SOBOTA. An examination of the anti-adherence activity of cranberry juice on urinary and non-urinary bacterial isolates. *Microbios.* 55: 173-181, 1989.
- SHERMAN, PM., ACRES, SD., SADOWSKI, PL., SPRINGER, JA., BRAY, B., RAYBOULD, TJ. y CC. MUSCOPLANT. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *E. coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 42: 653-658, 1993.
- SING, VK. y Z. ANWAR-ALI. Folk medicines of Aligarh (Uttar Pradesh) India. *Fitoterapia.* No.61:483-499, 1989.
- SOBOTA, AE. Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infection. *J. Urol.* 131: 1013-1016, 1984.
- SOLOWAY, MS. Cranberry juice as a urine acidifier. *JAMA*, 260 (10): 1465, 1988.
- STENQVIST, K., SANDBERG, T., AHLSTEDT, S., KORHONEN, T.K. y C. SANDBORG EDEN. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics and antibodies on the of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells in vitro. *Scand. J. Infect. Dis.* 33: 104-107, 1987.
- SVENNERHOLM, AM., HOLMGREN, J. y DA. SACK. Development of oral vaccines against ETEC diarrhoea. *Vaccine.* 7: 196, 1989.
- SVENNERHOLM, AM. Colonization factors of ETEC isolated from children with diarrhoea in Argentina. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1893, 1991.
- SVENSON, E., KALLENIOUS, G., KORHONEN, TK., MOLBY, R., ROBERTS, JA., TULLUS, K. y J. WINBERG. Initiation of clinical pyelonephritis. The role of P-fimbrial mediated bacterial adhesion. *Contrib. Nephrol.* 39: 252-272, 1984.
- TAKEDA, Y. EHEC. *World Health Statistics. Quarterly.* 50(1/2): 15-26, 1997.
- TRAINIG, Z., BRENNER, J., KARNITZER, L., TAMARIN, R., COHEN, A. y A., MEIRON. Oral passive immunization of newborns calves against ETCE. *Refuah. Vet.* 38: 1-16, 1981.
- VAINASEN, V., LOUNATMAA, K. y TK. KORHONEN. Effects of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination, adhesion, and ultrastructure of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 22: 120-127, 1982.
- VELAZQUEZ, B., BARRETO, G., VIDAL, L. y N. IZQUIERDO. Diagnóstico y tratamiento de la colibacilosis porcina. *Rev. Prod. Animal.* 6 (2): 139-141, 1991.
- VOSBECK, K., HANDSCHIN, H., MENGE, EB. y O. ZAK. Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on adhesiveness of *Escherichia coli* in vitro. *Rev. Infect. Dis.* 1: 845-851, 1979.
- VOSBECK, K., METT, H., HUBER, U., BOHN, J. y M. PETIGNAT. Effects of low concentrations of antibiotics *Escherichia coli* adhesion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 21: 864-869, 1982.
- WALKER, EB., BARNEY, DP., MICKELSEN, JN., WALTON, RJ. y RA. MICKELSEN. Cranberry concentrate: UTI prophylaxis. *The Journal of Family Practice.* 45 (2): 167-168, 1997.
- Wenneras, C., Holmgren, J. y AM. Svennerholm: The binding of colonization factor antigens to intestinal cell membrane proteins. *FEMS. Microbiol. Lett.* 66: 107, 1990.
- WILL, L.A. Controlling food-borne infection. Libro de discursos de la Escuela Agrotécnica Internacional en Cuba 1995. Ed. M. E. MESINGER. Agroservices Foundation. 104-106, 1995a.
- WILL, L.A. Rabies and other zoonotic disease effects on animal production. Libro de discursos de la Escuela de Agrotécnica en Cuba 1995; Ed. ME. Mesinger, Agroservices Foundation 102-103, 1995b.

- WONG, I., MORENO, M., MOLINO, M., VALDERRAMA, J., JOGLER, M., HORRACH, M., BOVER, E., BORROTO, A., BASULTO, R., CALZADO I., HERNÁNDEZ, R., HERRERA, L., SILVA, R., Y J. DE LA FUENTE. Immunity and protection elicited by recombinant vaccine against ECET. *Biotecnología Aplicada*. 12 (1): 9-15, 1995.
- WONG, I., MORENO, M., BOVER, E., BASULTO, R., VALDERRAMA, J., BORROTO, A., FERNÁNDEZ, G., RAMIRO, M., GONZÁLEZ, N., EXPÓSITO, M., SEGURA, R., ZALAZAR, E., AGRAZ, A., JIMÉNEZ, J., HERRERA, L. y J. DE LA FUENTE. Eficacia en condiciones de campo de una vacuna recombinante contra la colibacilosis porcina. *Biotecnología Aplicada*. 13: 16-19, 1996.
- WRAY, C. Enteric diseases in animal caused by *E. coli*. Their control and prevention, *Biochemical Society Transaction*. 12(2): 191-193, 1984
- ZAFRIRI, D., OFEK, I., ADAR, R., POCINO, M. y N. SHARON. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 a type P fimbriated *Escherichia coli* to Eucaryotic cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (1): 92-8, 1989.

Tabla 1: Acción inhibitoria de los extractos de *Eucalyptus* (mg/mL) sobre *E. coli* G7 (Barreto y Campal, 2001)

Forma de extracción	Especie	Acción inhibitoria			
		K88		Crecimiento	
		+	-	+	-
Decocción	<i>E. saligna</i>	10,5-17,5	21	70-140	35
Infusión	<i>E. saligna</i>	8,75-17,5	21	35-140	17,5
Extracto acuoso	<i>E. saligna</i>	N.D	21-70*	140	N.D
Decocción	<i>E. citriodora</i>	35-70	N.D	N.D	70-140
Infusión	<i>E. citriodora</i>	N.D	N.D	N.D	N.D
Extracto acuoso	<i>E. citriodora</i>	35	N.D	N.D	70

Leyenda

N.D. = No determinado + = poseen acción inhibitoria - = no poseen acción inhibitoria

* = Datos reportados por Barreto *et al.* (1995)

Tabla 2: Efecto de los extractos sobre la expresión fimbrial y sus receptores

EXTRACTOS	EFEECTO EN FIMBRIAS	EFEECTO EN RECEPTORES
<i>A. aspera</i> (etanol al 90%)	-	-
<i>A. aspera</i> (etanol al 20%)	-	-
<i>A. aspera</i> (decocción)	-	+
<i>L. virginicum</i> (etanol al 90%)	+	+
<i>L. virginicum</i> (etanol al 20%)	-	-
<i>L. virginicum</i> (decocción)	-	-
<i>A. conizoides</i> (etanol al 90%)	-	-
<i>A. conizoides</i> (etanol al 20%)	-	-
<i>A. conizoides</i> (decocción)	-	-
<i>Z. officinale</i> (etanol al 90%)	-	-
<i>Z. officinale</i> (etanol al 20%)	-	+
<i>Z. officinale</i> (decocción)	-	-
<i>C. longa</i> (etanol al 90%)	+	+
<i>C. longa</i> (etanol al 20%)	+	+
<i>C. longa</i> (decocción)	+	-
<i>C. speciosus</i> (etanol al 90%)	+	+
<i>C. speciosus</i> (etanol al 20%)	-	+
<i>C. speciosus</i> (decocción)	+	-

Leyenda: + = adhesión positiva (fimbrias y receptores no alterados) - = no adhesión (no expresión fimbrial o receptores alterados)